

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):



### **BLACK BORDERS**

- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :  
(A n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction).

2 518 755

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

**N° 81 24131**

(54) Sonde contenant un acide nucléique modifié et reconnaissable par des anticorps spécifiques et utilisation de cette sonde pour détecter et caractériser une séquence d'ADN homologue.

(51) Classification internationale (Int. Cl. <sup>3</sup>). G 01 N 33/54.

(22) Date de dépôt..... 23 décembre 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du  
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 25 du 24-6-1983.

(71) Déposant : INSTITUT PASTEUR et CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE,  
établissement public. — FR.

(72) Invention de : Paul Tchen, Anne Brigitte Cami, Marc Leng et Philippe Kourilsky.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Plasseraud,  
84, rue d'Amsterdam, 75009 Paris.

- 1 -

Sonde contenant un acide nucléique modifié et reconnaissable par des anticorps spécifiques et utilisation de cette sonde pour détecter et caractériser une séquence d'ADN homologue

-----

L'invention est relative à une sonde contenant un acide nucléique modifié et reconnaissable par des anticorps spécifiques et à l'utilisation de cette sonde pour détecter et caractériser une séquence d'ADN homologue dans un échantillon susceptible de le contenir. Plus particulièrement l'invention concerne une sonde modifiée chimiquement de telle sorte qu'elle puisse, après hybridation avec la séquence d'ADN homologue recherchée, être détectée par des anticorps spécifiques à l'égard de la sonde elle même.

Il est connu que des ADN sont susceptibles de réagir dans des conditions appropriées avec des substances carcinogènes, telles que le N-acétoxy-N-2-acétylamino-fluorène, pour former un produit susceptible d'être reconnu par des anticorps formés, d'une part, contre le N-2(guanosine-8-yl)-acétylamino-fluorène et, d'autre part, contre les mêmes ADN modifiés par le N-acétoxy-N-2-acétylamino-fluorène. Ces techniques ont notamment été décrites dans un article de Gilbert de MURCIA et collaborateurs intitulé "Visualisation par microscopie électronique des sites de fixation du N-acétoxy-N-2-acétylamino-fluorène sur un ADN de ColE 1 au moyen d'anticorps spécifiques" (Proc. Natl. Acad. Sci USA, tome 76, N° 12, 6 076 - 6 080 Dec. 1979).

Dans les conditions décrites par ces auteurs il est possible de modifier de 0,07 à 0,15 % des bases de l'ADN traité par le N-acétoxy-N-2-acétylamino-fluorène, les points de fixation de cette dernière substance chimique sur l'ADN pouvant ensuite être repérés par microscopie électronique, après réaction préalable de l'ADN ainsi modifié avec des anticorps du genre sus-indiqué préalablement formés chez le lapin, puis avec des anti-immunoglobulines de lapins marqués à la ferritine. La technique décrite permet par conséquent de distinguer des ADN natifs sains

- 2 -

et des ADN ayant été soumis à l'action de substances carcinogènes.

L'invention repose sur la découverte que la modification d'une séquence d'ADN par le N-acétoxy-N-2-acétylamino-5-fluorène n'altérerait pas, après dénaturation préalable de cet ADN modifié, sa capacité de s'hybrider avec une séquence complémentaire d'ADN ne portant pas de tels groupes de modification, lorsque ces séquences sont placées dans des conditions permettant une telle hybridation.

10 L'invention tire profit de cette découverte pour proposer un procédé perfectionné de détection de la présence éventuelle et de la caractérisation d'une séquence ou d'un fragment déterminé d'acide nucléique, notamment d'un gène au sein d'une composition susceptible de le contenir.

15 Le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que l'on met en contact avec la composition présumée contenir une séquence ou un fragment déterminé d'acide nucléique; une sonde contenant un acide nucléique complémentaire susceptible de s'hybrider avec la séquence d'acide 20 nucléique ou le gène recherché, la sonde étant plus particulièrement caractérisée en ce qu'elle porte au moins un groupe N-2 acétylamino-5-fluorène fixé de façon covalente à au moins l'une des bases de cette sonde, l'éventuelle présence de la séquence d'acide nucléique ou de gène recherché étant 25 ensuite révélablè par action d'anticorps efficaces vis-à-vis de la N-2-(guanosine -8-yl)-acétylamino-5-fluorène ou préalablement préparés vis-à-vis de la sonde portant des résidus d'acétylamino-5-fluorène (ci-après dénommés DNA-AAF).

30 Il va de soi que le procédé revendiqué dans le cadre de la présente demande s'étend à l'utilisation de tout autre groupe chimique fixable sur un ADN dans les conditions décrites par de MURCIA et coll.

Naturellement, il va de soi que le DNA-AAF 35 utilisé comme sonde est mis en présence de l'ADN à étudier dans des conditions permettant le réappariment de séquences complémentaires, ce qui implique naturellement une dénatura-

- 3 -

tion préalable dans des conditions bien connues des ADN susceptibles de s'hybrider mutuellement.

Après hybridation, l'ADN-AAF non hybridé de façon spécifique est de préférence éliminé par rinçage avant que l'on ne procède à la détection des hybrides formés, notamment par leur mise en présence avec des anticorps anti-DNA-AAF, qui peuvent alors se fixer sur la sonde à la fois modifiée et hybridée avec la séquence d'ADN recherchée, lorsque celle-ci était présente dans la composition utilisée.

Après rinçage des anticorps excédentaires encore présents, les anticorps fixés peuvent être, soit précipités, soit révélés.

De préférence, la révélation est faite au moyen d'un anticorps anti DNA-AAF, avantageusement marqué par une enzyme dont on peut ensuite détecter ou doser l'activité vis-à-vis d'un substrat spécifique. Avantageusement on utilisera celles des enzymes qui sont susceptibles d'induire une réaction colorée au niveau des substrats correspondants.

La révélation à l'aide d'enzymes donnant des réactions colorées est très rapide.

La méthode est très sensible, surtout si on utilise des systèmes amplificateurs (chapelets, arbres ou boules d'anticorps associés à des enzymes), de sorte qu'elle permette de localiser des gènes après hybridation in situ sur des chromosomes, par exemple dans le cas de diagnostics prénatals.

La méthode peut être quantitative, par mesure de l'intensité de la coloration.

Des caractéristiques supplémentaires de l'invention apparaîtront encore au cours de la description qui suit d'un exemple type de mise en oeuvre du procédé selon l'invention.

On a fait usage des matières et méthodes suivantes :

Les A D N :

- ADN de phage pBR 322 portant une séquence de gène de ribosome de hamster de 6,6 kb insérée au site EcoRI (clône PWE 6)

- ADN distinct de phage  $\lambda$  57 comme témoin négatif.

L'A D N traité à l'A A F (DNA-AAF)

- De l'ADN du clône PWE6 a été linéarisé (par l'enzyme de restriction Sal I) et traité à l'AAF selon la technique décrite par G. de MURCIA et al (PNAS vol. 76 N° 12 p. 6 076 - 6 080 1979). Le nombre des guanines modifiées a été estimé à 2% du nombre de paires de bases par mesure de la densité optique à 305 nm et 260 nm.

Les anticorps :

- sérum DNA-AAF obtenu par immunisation d'un lapin
- anticorps anti Guo-AAF de lapin purifié sur colonne d'affinité,
- anticorps de chèvre anti IgG de lapin liés à de la peroxydase.

- Les anticorps ont été obtenus dans les conditions décrites dans l'article susdit.

Essai de détection du DNA-AAF

- Des quantités variables de DNA-AAF ont été déposées sur des filtres de nitrocellulose (Schleicher et Schüll, type BA-85) de 5 mm de diamètre.

- L'ADN a préalablement été dilué dans une solution 2 x SSC et dénaturé à 100°C, pendant 5 minutes.

- Après dépôt, les membranes ont été mises au four à 80°C pendant 2 heures.

- Les membranes ont ensuite été traitées avec une solution 3% albumine bovine (SIGMA réf. A. 7888), 1 SSC, à 40°C pendant une heure; puis incubées 30 minutes à température ambiante dans la même solution en présence d'anticorps anti-DNA-AAF ou anti-Guo-AAF de lapin à 2 µg/ml final.

- Après incubation, les membranes ont été lavées

- 5 -

7 fois avec du PBS, à température ambiante, puis mises à incuber 30 minutes dans une solution 3% albumine bovine, 1 SSC contenant des anticorps de chèvre anti IgG de lapin liés à de la peroxydase à 2 µg/ml final.

5 Après lavage 7 fois avec du PBS, la réaction colorée a été faite par addition de la solution suivante, préparée extemporanément :

- 2 mg de 3-amino 9 éthylcarbazol (SIGMA ref. A 5754) dissous dans 0,5 ml de N-N' diméthyl formamide,
- 10 - 9,5 ml de tampon acétate acétique 0,05 M pH 5,1,
- 10 µl d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merk ref. 7209)

Test d'hybridation avec du DNA-AAF utilisé comme sonde .

Dépôt de quantités variables de DNA PWE 6 :

- 1) 100 ng
- 15 2) 10 ng
- 3) 1 ng
- 4) 100 pg

Après dépôt, les filtres sont mis à 80°C pendant 2 heures, puis préhybridés 4 heures à 68°C dans une solution 6 x SSC et 10 x Denhardt.

( 1 x Denhardt contenant :

- 0,02% de Polyvinyl pyrrolidone,,
- 0,02% du réactif commercialisé sous la désignation FICOLLE 400 par la Société "Pharmacia fine Chemicals".
- 25 0,02% d'albumine bovine )

Ils sont ensuite hybridés dans une solution 2 x SSC 1 x Denhardt en présence de 200 µl par membrane de solution de DNA-AAF préalablement dénaturé contenant respectivement :

- 10 ng/ml final
- 1 ng/ml final et
- 100 pg/ml final

Après hybridation, les filtres ont été lavés

30 minutes dans	2	x	SSC	1	Denhardt
" "	1	x	SSC	1	Denhardt
" "	0,5	x	SSC	1	Denhardt
" "	0,2	x	SSC	1	Denhardt
1 heure	0,1	x	SSC	1	Denhardt

puis incubés pendant 1 heure à 40°C dans une solution contenant 3% d'albumine à 1 xSSC . La suite des opérations a été faite comme précédemment (mise en présence avec des anticorps anti-DNA-AAF ou anti Guo-AAF, lavage PBS, anticorps + peroxydase, lavage PBS et révélation).

Après révélation on observe des taches colorées dont l'intensité (plus forte pour les concentrations élevées, plus faible pour des concentrations basses d'ADN) dépend de la quantité d'ADN hybridé.

La méthode de détection sus-indiquée a conduit à des résultats entièrement négatifs au terme d'essais d'hybridation réalisés entre le témoin négatif (utilisé en des quantités atteignant jusqu'à 90 nanogrammes) et le DNA-AAF.

L'invention ne se limite évidemment pas aux modes de réalisation décrits ci-dessus à titre d'exemples et l'homme de l'art peut y apporter des modifications sans pour autant sortir du cadre des revendications ci-après.

Au titre des variantes utilisables au niveau de la détection des hybrides formés avec la sonde selon l'invention, on citera :

- la révélation des hybrides formés par la radio-activité, par exemple grâce à l'utilisation d'anticorps anti-DNA-AAF rendus radioactifs par de l'iode 125 ou 131 ou de protéine A radioactive, qui va se fixer sur les anticorps ,

Enfin, au titre des variantes d'applications possibles, on citera l'application de la sonde selon l'invention à la purification d'un ADN complémentaire contenu dans une composition initiale, notamment au moyen

- de protéine A associée à un support solide (par exemple constitué de billes d'agarose),

- d'anticorps précipitants associés ou non à un support solide (billes d'agarose, de latex, etc),

pour assurer la précipitation sélective de l'hybride formé.

Enfin fait partie des modifications restant dans le cadre des revendications la substitution possible de l'AAF par toute molécule équivalente carcinogène ou ana-



2518755

- 7 -

logue susceptible de se fixer dans les mêmes conditions sur certains au moins des bases des nucléotides dont est constituée la sonde.

REVENDICATIONS

- 1 - Procédé de détection de la présence d'une séquence d'acide nucléique telle qu'un gène ou fragment de gène dans une composition ou échantillon présumé la contenir, caractérisé en ce que l'on met en contact cette composition avec une sonde contenant un acide nucléique complémentaire de la séquence d'acide nucléique ou du gène recherché dans des conditions permettant notamment cette hybridation, ladite sonde portant au moins un groupe N-2-acétylamino fluorène fixé de façon covalente à au moins
- 5 l'une des bases de cette sonde, l'éventuelle présence de la séquence d'acide nucléique ou de gène recherché étant ensuite révélable par action d'anticorps efficaces vis-à-vis de la N-2-(guanosine-8-yl)-acétylamino fluorène ou préalablement préparés vis-à-vis de la sonde portant des
- 10 résidus d'acétylamino fluorène.
- 2 - Procédé selon la revendication 1 comprenant en outre la séparation de l'hybride formé, en vue de la purification de ladite séquence d'acide nucléique, notamment par précipitation.
- 15